CH-SAH (6), сходная по происхождению с использованной в наших исследованиях LMH. Эта группа учёных доказала, что титр накопленного вируса в культуре CH-SAH в 100 раз выше, чем в культуре клеток печени эмбриона цыплёнка.

Выводы

Выделены два полевых изолята, относящиеся к генетическим группам B (серотип 5) и D1 (серотип 8). Для выделения использовали перемежающиеся пассажи на куриных эмбрионах, культурах клеток печени куриного эмбриона и LMH. Установлено, что применение только куриных эмбрионов неэффективно для пассирования полевых изолятов аденовируса птиц 1 группы. Проведение заключительных пассажей на культурах клеток печени куриного эмбриона и LMH позволило выделить вышеперечисленные изоляты.

РЕЗЮМЕ

В результате проведённой работы были выделены два полевых изолята аденовирусов птиц 1 группы, относящиеся к генетическим группам B (серотип 5) и D1 (серотип 8). Для выделения использовали перемежающиеся пассажи на куриных эмбрионах, культурах клеток LMH и печени куриного эмбриона. Установлено, что применение только куриных эмбрионов не эффективно для пассирования полевых изолятов аденовируса птиц 1 группы. Проведение заключительных пассажей на культурах клеток печени куриного эмбриона и LMH позволило выделить вышеперечисленные изоляты.

SUMMARY

Three field isolates FAdVs-1, belonging to various genetic groups were isolated using discontinuous passage in chicken embryos, LMH and chicken embryo liver cell cultures. Two isolates were adapted to cell culture, they efficiently replicated in vitro. Chicken embryos were shown to be inefficient for the virus passage. Therefore, the isolation of FAdVs-1 belonging to B, D1 and D2 genetic groups requires LMH and chicken embryo liver cell cultures.

Литература

1. Бакулин, В.А. Аденовирусный гепатит с тельцами-включениями-гидроперикардит кур / В.А. Бакулин //Зооиндустрия. 2005. №2. с. 2-3.
2. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц / Б.У. Калнек, Х. Джон Барн, Ч. У. Биэр [и др.]; / пер. с англ. И. Григорьева, С. Дорош, Н. Хрущёва, [и др.] М.: Аквариум-Бук, 2003. 1232 с. + 32 с. вкл., ил.
3. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьёв, Н.В. Фомина. М.: ВНИТИБП. 928 с., ил.
4. Диагностика и профилактика аденовирусных болезней сельскохозяйственной птицы /В.В. Борисов, А.В. Борисов, В.В. Дрыгин [и др.] //Современные аспекты патологии животных: докл. посвящён 40-летию со дня основания института. Владимир, 1999. С. 127-136.
5. Назаров, Р.И. Синдром гидроперикардита – новая угроза птицеводству /Р.И. Назаров, Д.С. Сурнев // Актуальные проблемы болезней животных в современных условиях: материалы Междунар. Науч.-практ. конф. Душанбе, 2003. С. 134-135.
6. Growth characteristics of fowl adenovirus type 8 in a chicken hepatoma cell line / H.S. Alexander, P. Huber, J. Cao [et al.] // Virol. Methods. 1998. Vol. 74, № 1. P. 9-14.

УДК 619:578.831.1:616-079.4

И.П. Пчелкина, С.Н. Колосов, Т.Б. Манин, И.А. Чвала, Л.О. Щербакова, С.К. Старов, В.В. Дрыгин

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2006 ГОДУ

Введение

Ньюкаслская болезнь (НБ) относится к особо опасным болезням птиц. Возбудителем НБ является парамиксовирус птиц 1 (APMV-1). APMV объединены в род *Avulovirus* семейства *Paramyxoviridae* [16]. Парамиксовирус голубей типа 1 (PPMV-1) является антигенным и генетическим вариантом APMV-1. PPMV-1 представляет угрозу для сельскохозяйственных птиц, поскольку может инфицировать и вызвать заболевание домашних птиц [8]. Парамиксовирусы обладают одноцепочечным несегментированным РНК-геномом негативной полярности, состоящим более чем из 15 000 нуклеотидов. Геном ВНБ содержит 6 генов в порядке 3’-NP-P-M-F-HN-L-5’, которые кодируют 6 главных полипептидов

(нуклеопротеин, фосфопротеин, матриксный белок, белок слияния, гемагглютинин-нейраминидазу и РНК-зависимую РНК-полимеразу, соответственно) [15].

По молекулярно-биологическим свойствам первичная структура сайта расщепления белка F_0 является одним из основных критериев оценки вирулентности штаммов вируса НБ. Известны аминокислотные последовательности сайта расщепления белка F_0, характерные для вирулентных и авирулентных штаммов ВНБ (112R/K-R-Q-K/R-R-F117 – структура, характеризующая вирулентные штаммы, 112G/E-K/R-Q-G/E-R-L117 – структура, характеризующая авирулентные штаммы) [18, 24].

Быстрое обнаружение и оценка вирулентности ВНБ являются решающими факторами для купирования вспышек и минимизации ущерба от них. В настоящее время для диагностики НБ успешно используется метод индикации вируса на основе обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР), а для идентификации – нуклеотидное секвенирование и сравнительный анализ последовательностей. Анализ нуклеотидных последовательностей позволяет дифференцировать антигенно сходные вирусы, хотя и не идентичные генетически, создавая возможность получения важных эпидемиологических данных о происхождении того или иного изолята ВНБ [5]. Нуклеотидное секвенирование продуктов ОТ-ПЦР и филогенетический анализ были использованы рядом авторов для оценки генетических различий и генотипов ВНБ [7, 9, 12, 19, 21, 23]. В исследованиях по предварительной характеристике ВНБ с помощью рестрикционного анализа было определено восемь генотипов (с I по VIII), а внутри них с помощью нуклеотидного секвенирования и несколько подгрупп [1, 10, 11, 13, 17, 20, 21, 22, 25]. Предполагается, что использование этого набора данных позволит очень быстро и точно группировать вирусы и делать заключения о происхождении вспышек ВНБ [2].

В настоящем исследовании получены нуклеотидные последовательности для 18 изолятов ВНБ, выявленных на территории Российской Федерации в 2006 г. Был проанализирован фрагмент длиной 200 нуклеотидов гена F белка слияния, который включает область, кодирующую сайт активирующего расщепления предшественника белка F_0 как носителя одной из главных детерминант вирулентности ВНБ.

Целью данной работы было достижение лучшего понимания филогенетических отношений между изучаемыми изолятами и уже известными вирусами APMV-1.

Материалы и методы

Изоляты. В ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», (г. Владимир) поступал на исследование патологический материал от диких, синантропных и домашних птиц из приусадебных хозяйств различных регионов Российской Федерации. Все пробы исследовали с использованием ОТ-ПЦР на наличие генома ВНБ и гриппа птиц. Список исследованных изолятов и некоторые их характеристики приведены в табл. 2.

Выделение суммарной РНК проводили, используя универсальный набор реактивов для пробоподготовки («Биоком», Москва) в соответствии с инструкцией к набору.

Синтез кДНК. Синтез первой цепи комплементарной ДНК на вирусной РНК проводили с использованием РНК-зависимой ДНК-полимеразы вируса миелобластоза птиц («Promega», США). Для реакции обратной транскрипции 10 мкл раствора суммарной РНК добавляли в реакционную смесь, содержащую 2 мкл 10 мМ dNTP, 4 мкл 5х ревертазного буфера, 1 мкл 10 мкМ вирусспецифичного прямого праймера ndv-f11-124f (табл. 1), 0,25 мкл фермента и воду до конечного объёма 20 мкл, перемешивали и инкубировали при 42° С в течение 30 мин. После инкубации инактивировали фермент при 95° С 3 мин. и быстро охлаждали смесь.

Амплификация кДНК. ПЦР проводили в программируемом амплификаторе PTC-100 MiniCycler («MJ Research Inc», США). В пробирку объемом 0,5 мл вносили 4 мкл раствора кДНК и 21 мкл реакционной смеси, содержащей по 1 мкл 10 мкМ праймеров ndv-f11-124f и ndf-f11-757r, фланкирующих область в F гене (табл. 1); 1 мкл 10 мМ dNTP; 2,5 мкл 10х буфера для ПЦР; 2,5 мкл 25 мМ $MgCl_2$; 0,25 мкл 500 ед. Taq ДНК-полимеразы («Promega», США), воду до конечного объема 25 мкл, сверху наслаивали 25 мкл минерального масла. Проводили амплификацию при следующем режиме: 95° С – 5 мин., 35 циклов 94° С – 0,5 мин., 52° С – 0,5 мин., 72° С – 1 мин.

Индикация гена F. Появление и накопление в результате реакции фрагмента ДНК длиной 633 пары нуклеотидов свидетельствует о наличии в исследуемом материале вируса НБ. Для повышения чувствительности реакции, при отсутствии вирусспецифической полосы после первой ПЦР, использовали «гнездовой» вариант ПЦР с

Таблица 1

Структура праймеров, использованных для амплификации фрагментов гена F

№	Краткое обозначение	Структура олигонуклеотида
1	ndv_fII_124f	5’- ATT-GT(A/G)-GTA-ACA-GGA-GAT-AA-3’
2	ndv_fII_757r	5’- TGA-TTG-TTC-CCT-A(T/C)A-CCT-AA -3’
3	ndv_fII_189f	5’- AAG-TTG-CTC-CC(A/G)-AAT-ATG-CC -3’
4	ndv_fII_541r	5’- TT(A/G)-ACA-AA(T/C)-TGC-TGC-ATC-TT-3’

Таблица 2

Изоляты ВНБ, выявленные на территории Российской Федерации 2006 г.

№	Характеристика изолята				
	Место выделения	вид птицы	название	сайт расщепления	генотип
1	Московская обл.	голубь	Pi/Rus/Moscow/0207/06	KRKKRF	4a(VIb/2)
2	Московская обл.	голубь	Pi/Rus/Moscow/810/06	KRQKRF	4a(VIb/2)
3	Нижегородская обл.	голубь	Pi/Rus/Nizhny_Novgorod/0206/06	KRQKRF	4a(VIb/2)
4	РСО-Алания[1]	ворона	Crow/Rus/Alania/0167/06	RRQKRF	4a(VIa)
5	Владимирская обл.	голубь	Pi/Rus/Vladimir/772/06	RRQKRF	4b(VIb)
6	РСО-Алания	голубь, лебедь, галка	Mix/Rus/Alania/0156/06	RRKKRF	4b(VIb)
7	РСО-Алания	голубь, ворона	Mix/Rus/Alania/0164/06	RRRKRF	4b(VIb)
8	РСО-Алания	голубь	Pi/Rus/Alania/0161/06	RRQKRF	5d(VIId)
9	Владимирская обл.	курица	Ck/Rus/Vladimir/0707/06	RRQKRF	5d(VIId)

1 – Республика Северная Осетия (Алания)

парой внутренних праймеров ndv-f11-189f и ndf-f11-541r (табл. 1), позволяющих амплифицировать фрагменты кДНК размером 352 п. н. (15-25 циклов).

Секвенирование кДНК. Продукты ПЦР очищали с помощью набора реактивов «WizardTM PCR Preps DNA Purification Kit» («Promega», США). Нуклеотидную последовательность фрагмента F гена определяли методом прямого секвенирования амплифицированных фрагментов с помощью набора «fmol DNA Sequencing System» («Promega», США).

Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили, используя пакет прикладных программ BioEdit, версия 7.0.5.3. Выравнивание осуществляли с помощью программы ClustalW. Для сравнения использовали нуклеотидные последовательности вируса ньюкаслской болезни, опубликованные в базе данных GenBank. Дендрограмма получена методом NJ по фрагменту гена F (220-441) длиной 200 н.

Результаты и обсуждение

Методом ОТ-ПЦР в 9 пробах выявлен геном вируса НБ. Определены первичные структуры фрагмента гена F, кодирующего сайт расщепления белка F_0. Соответствующие аминокислотные последовательности представлены в табл. 2. Изучение аминокислотных последовательностей 9 изолятов вируса НБ показало, что у всех изолятов в структуре сайта расщепления присутствовали две пары основных аминокислотных остатков, что дает возможность отнести эти изоляты к вирулентным. Из 9 вирулентных изолятов 4 имели последовательность ^{112}RRQKR-F^{117}, два – ^{112}KRQKR-F^{117}, один – ^{112}RRRKR-F^{117}, один – ^{112}RRKKR-F^{117}, один – ^{112}KRKKR-F^{117}.

Филогенетический анализ с использованием последовательностей, опубликованных в GenBank, позволил провести генотипирование изученных изолятов (рис.). Филогенетическое дерево дает возможность визуально оценить отношения между различными группами вирусов. Генотипы на рисунке и в тексте приведены по E.W. Aldous и др. [2] (арабские цифры) и B. Lomniczi и др. [21], и J. Herczeg и др. [25] (римские цифры). Было показано, что 9 изолятов ВНБ, выявленных на территории Российской Федерации в 2006 г., относились к двум генотипам, а именно 4(VI), 5(VII).

Два изолята ВНБ были классифицированы в подгруппу 5d(VIId) генотипа 5(VII). Генотип 5(VII) является преобладающим генотипом, ответственным за вспышки НБ с конца прошлого столетия по всему миру [17]. Ближайшие к груп-

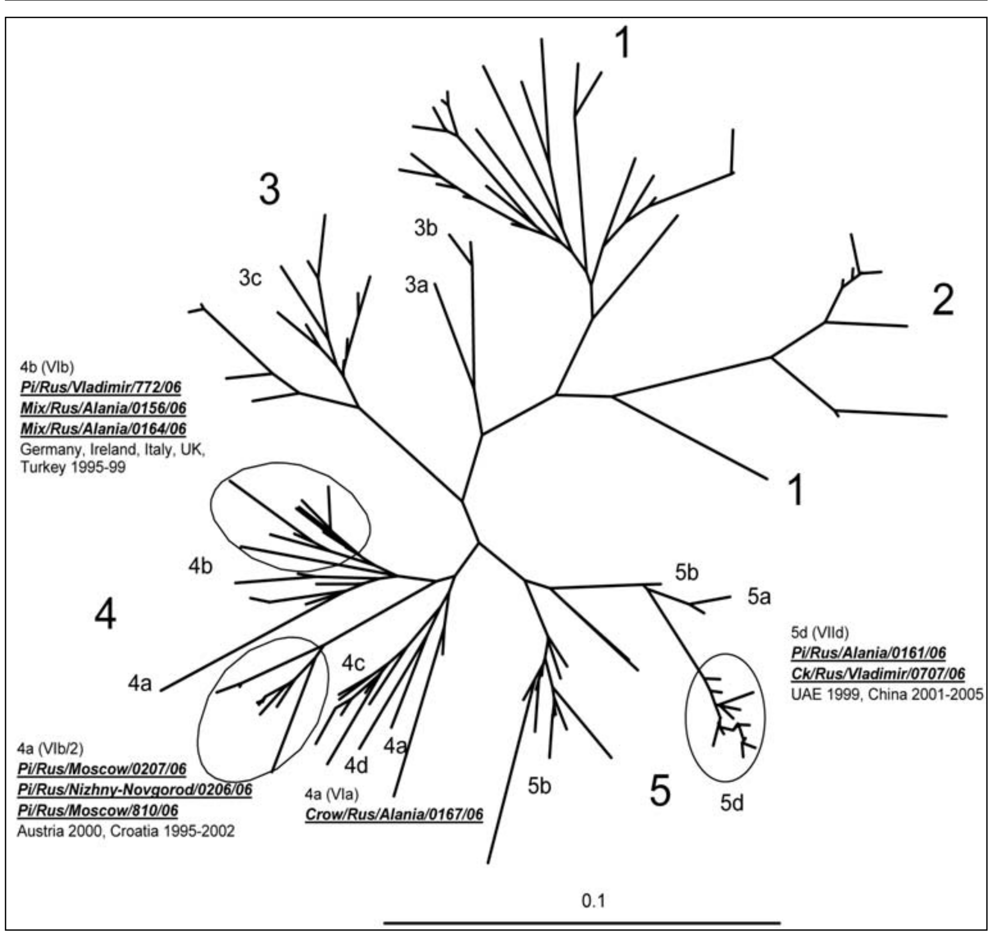


Рис. Филограмма, демонстрирующая положение выявленных изолятов по отношению к существующим генотипам ВНБ (классификация и референтные последовательности взяты из работы E.W. Aldous и др. (2)). Филограмма получена методом NJ по фрагменту гена F (220-441) длиной 202 н.

пе российских изолятов были выделены в 1999 г. в Объединенных Арабских Эмиратах и Китае в 2001-2005 гг. (AY175632, AY175684, AY175685, AF378260, DQ198292, DQ439940, DQ485230) [17]. Интересно отметить, что российские изоляты 2006 года, относящиеся к подгруппе 5d(VIId), были выявлены как у домашних птиц из приусадебных хозяйств (куры), так и у синантропных птиц (голубь).

Три изолята (Pi/Rus/Vladimir/772/06, Mix/Rus/Alaniya/0156/06, Mix/Rus/Alaniya/0164/06), выявленные у голубей и в смешанных пробах, относятся к подгруппе 4b(VIb) генотипа 4(VI). Основу этой подгруппы формируют голубиные парамиксовирусы типа 1 (PPMV-1), вызвавшие продолжающуюся с начала 1980-х гг. панзоотию среди голубей и птиц других видов [4, 8, 14]. Ближайшими родственниками этой группы изолятов являются изоляты, выделенные в 1995-1999 гг. в Турции, Италии, Германии, Ирландии и Великобритании и отнесенные к подгруппе поздних европейских изолятов PPMV-1 [3].

Другую группу того же генотипа 4(VI) представляют 3 изолята (Pi/Rus/Moscow/0207/06, Pi/Rus/Moscow/810/06, Pi/Rus/Nizhny_Novgorod/0206/06), выделенные от голубей в центральных областях России. По филогенетической принадлежности эти изоляты относились к группе, в которую также входит изолят, выделенный от голубя в Австрии в 2000 г. (AY471789) [3], и несколько изолятов, выделенных от голубей и горлиц с 1995 по 2002 гг. в Хорватии (AY150144, AY150162, AY150163, AY150165) [22]. По своим серологическим характеристикам (характер связывания с панелью моноклональных антител) [2, 3, 6] изолят из Австрии принадлежал к группе P, к которой принадлежат лишь изоляты PPMV-1 подгруппы 4b(VIb). Изоляты из Хорватии не относи-

лись к группе P по характеру связывания моноклональных антител [22]. E.W. Aldous и др. [3] отнесли изолят из Австрии к подгруппе 4a, а D. Ujvari и др. [22] хорватские изоляты – к особой подгруппе VIb/2. Таким образом, генетическая линия, состоящая из изолята AY471789, изолятов из Хорватии и вновь выявленных российских изолятов, по-видимому, представляет собой особую подгруппу генотипа 4(VI) ВНБ, адаптированных, как и панзоотический подтип 4b(VIb) к голубям и отличный от последнего как в филогенетическом, так, скорее всего, и в серологическом отношении (по характеру связывания с панелью моноклональных антител). По нашему мнению, выявление новой линии ВНБ, адаптированной к отдельному виду или группе видов птиц, а также его филогенетические отношения с панзоотическим голубиным подтипом 4b(VIb) представляет большой интерес в плане изучения биологии ВНБ.

Также к генотипу 4, но совершенно другой подгруппе 4a(VIa), относится изолят от вороны Crow/Rus/Alaniya/0167/06. Ближайшим его соседом по филогенетическому дереву является изолят, выделенный в 1996 г. в Объединенных Арабских Эмиратах от сокола (AY175738). Последний изолят по серологическим свойствам отличается от голубиных вирусов [2, 3, 6].

Выводы

Вирусы НБ, выявленные на территории Российской Федерации, обладают высоким генетическим разнообразием, они принадлежат четырем подгруппам двух генотипов 4a(VIa), 4a(VIb/2), 4b(VIb), 5d(VIId). Почти каждая генетическая подгруппа вирусов имеет широкое географическое распространение на территории России: в центральной части России, на Северном Кавказе. Следует отметить, что разнообразен и видовой состав птиц, от которых выявлен вирус. Распространение ВНБ среди синантропных птиц (голуби, вороны, галки) представляет серьезную опасность для домашних птиц.

РЕЗЮМЕ

Проведен генетический анализ 9 изолятов вируса ньюкаслской болезни (ВНБ), выявленных у домашних и синантропных птиц из разных регионов Российской Федерации в 2006 г. Использовали ПЦР с последующим секвенированием и сравнительным анализом нуклеотидных последовательностей главной функциональной области гена F. Последовательность сайта расщепления F1/F2 всех изолятов была типичной для вирулентных парамиксовирусов птиц серотипа 1. Сайт расщепления F1/F2 большинства изолятов имел последовательность ^{112}RRQKRF^{117}, также встречались последовательности ^{112}KRQKRF^{117}, ^{112}RRRKRF^{117}, ^{112}RRKKRF^{117}, ^{112}KRKKRF^{117}. С использованием последовательностей фрагментов гена F длиной 200 н. исследованных изолятов и референтных штаммов ВНБ, полученных из GenBank, построили филогенетическое дерево. Филогенетический анализ показал, что все вновь охарактеризованные изоляты относятся к четырем подгруппам двух генотипов: 4a(VIa), 4a(VIb/2), 4b(VIb), 5d(VIId).

SUMMARY

The genetic analysis of 18 isolates of Newcastle disease virus (NDV), detected in poultry and synanthropic birds from different regions of the Russian Federation in 2006, was conducted. The PCR with the subsequent sequencing and comparative analysis of nucleotide sequences of the main functional region of F gene was used. The sequence of the F1/F2 cleavage site of all isolates was typical for virulent avian paramyxoviruses-1. The F1/F2 cleavage site of most of the isolates had the sequence of ^{112}RRQKRF^{117}, as well as the following sequences: ^{112}KRQKRF^{117}, ^{112}RRRKRF^{117}, ^{112}RRKKRF^{117}, ^{112}KRKKRF^{117}. The phylogenetic tree was formed using the sequences of F gene fragment of 200 nucleotides of the studied isolates and reference NDV strains obtained from GenBank. The phylogenetic analysis showed that all newly characterized isolates belonged to four subgroups of two genotypes: 4a(VIa), 4a(VIb/2), 4b(VIb), 5d(VIId).

Литература

1. A longitudinal study of velogenic Newcastle disease virus genotypes isolated in Italy between 1960 and 2000 / J. Herczeg, S. Pascucci, P. Massi [et al.] // Avian Pathol. 2001. Vol. 30. P. 163-168.
2. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis a partial nucleotide sequence of fusion protein gene / E.W. Aldous, J.K. Mynn, J. Banks, D.J Alexander // Avian Pathol. 2003. Vol. 32, № 3. P. 239-257.
3. A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (PPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons / E.W. Aldous, C.M. Fuller, J.K. Mynn, D.J. Alexander // Avian Pathol. 2004. Vol. 33, № 2. P. 258-269.
4. An outbreak of Newcastle disease in pheasants in Great Britain in May 1996 / D.J. Alexander, R.J. Manvell, K.M. Frost [et al.] // Vet. Rec. 1997. Vol. 140. P. 20-22.
5. Antigenic and genetic characterisation of Newcastle disease viruses isolated from outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997 / D.J. Alexander, J. Banks, M.S. Collins [et al.] // Vet. Rec. 1999. Vol. 145. P. 417-421.
6. Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies / D.J. Alexander, R.J. Manwell, J.P. Lowings [et al.] // Avian Pathol. 1997. Vol. 26. P. 399-418.
7. Antigenic and phylogenetic studies on a variant Newcastle disease virus using anti-fusion protein monoclonal antibodies and partial sequencing of the fusion protein gene / M.S. Collins, S. Franklin, I. Strong [et al.] // Avian Pathol. 1998. Vol. 27. P. 90-96.
8. Avian paramyxovirus type 1 infection of racing pi-

geons: 3. Epizootiological considerations / D.J. Alexander, G.W. Wilson, J.A. Thain, S.A. Lister // Vet. Rec. 1984 c. Vol. 115. P. 213-216.
9. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis / B.S. Seal, D.J. King, J.D. Bennett [et al.] // J. Clin. Microbiol. 1995. Vol. 33. P. 2624-2630.
10. Characterization of Newcastle disease viruses isolated in Italy in 2000 / G. Cattoli, R.J. Manvell, E. Tisato [et al.] // Avian Pathol. 2001. Vol. 30. P. 465-469.
11. Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the peoples Republic of China and Taiwan / L. Yu, Z.L. Wang, L. Chang [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2001. Vol. 39. P. 3512-3519.
12. Collins, M.S. Pathogenicity and phylogenetic evaluation of the variant Newcastle disease viruses termed pigeon PMV-1 viruses based on the nucleotide sequences of the fusion protein gene / M.S. Collins, I. Strong, D.J. Alexander // Arch. Virol. 1996. Vol. 141. P. 635-647.
13. Identification grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F gene / A. Ballagi-Pordany, E. Wehmann, J. Herczeg [et al.] // Arch. Virol. 1996. Vol. 141. P. 243-261.
14. Kaleta, E.F. The first isolation of the avian PMV-1 virus responsible for the current panzootic in pigeons? / E.F. Kaleta, D.J Alexander, P.H. Russell // Avian Pathol. 1985. Vol. 14. P. 553-557.
15. Lamb, R.A. Paramyxoviridae: the viruses and their replication / R. A. Lamb, D. Kolakofsky // Fundamental Virology Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2002. P. 1305-1340.
16. Mayo, M. A. Virus Taxonomy-Houston 2002 / M.A. Mayo // Arch. Virol. 2002. Vol. 147. P. 1071-1076.
17. Molecular epidemiological analysis of Newcastle disease virus isolated in China in 2005 / H. Liu, Z. Wang, Y. Wu [et al.] // J. Virol. Meth. 2006. Vol.140. P. 206-211.
18. Newcastle disease // O.I.E. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 2005. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00038.htm.
19. Newcastle disease virus evolution. 2. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent stains / T. Toyoda, T. Sakaguchi, H. Hirota [et al.] // Virology. 1989. Vol. 169. P. 273-282.
20. Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (Genotype VII) from recent outbreaks in Western Europe / C.Y. Yang, H. K. Shieh, Y.L. Lin [et al.] // Avian Dis. 1999. Vol. 43. P. 125-130.
21. Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and novel genotype (VII) / B. Lomniczi, E. Wehmann, J. Herczeg [et al.] // Arch. Virol. 1998. Vol. 143. P. 49-64.
22. Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (Columba livia) and suggests multiple species transmission / D. Ujvari, E. Wehmann, E. F. Kaleta [et al.] // Virus Research. 2003. Vol. 96. P. 63-73.
23. Seal, B.S. Analysis of matrix protein gene nucleotide sequence diversity among Newcastle disease virus isolates demonstrates that recent disease outbreaks are caused by viruses of psittacine origin / B.S. Seal // Virus Genes. 1996. Vol. 11. P. 217-224.
24. Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus / T. Toyoda, T. Sakaguchi, K. Imal [et al.] // Virology. 1987. Vol. 158. P. 242-247.
25. Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (VIIb) of which reached Southern Europe // J. Herczeg, E. Wehmann, R.R. Bragg [et al.] // Arch. Virol. 1999. Vol. 144. P. 2087-2099.

УДК 619:578.825.1:636.592:57.082.26

А.А. Пяткина, Ш.К. Куляшбекова

«МНОГОСЛОЙНЫЙ» МЕТОД КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА ГЕРПЕСА ИНДЕЕК

Введение

Технология изготовления вакцин против болезни Марека (БМ) [2, 5, 8] основана на культивировании вируса в клеточном монослое. С этой целью используют первично трипсинизированную культуру клеток куриных фибробластов (КФ) СПФ-эмбрионов кур [1, 3, 6], которую выращивают на плоскостенных матрасах или роллерных сосудах различных емкостей.

В связи с тем, что вирус болезни Марека является клеточно-ассоциированным, основная задача технологов состоит в получении наибольшего количества вирус-содержащих клеток. При этом важно подчеркнуть, что распространение возбудителя в живых тканях в основном происходит путем перемещения его через мембраны контактирующих клеток [1, 4, 7].

Целью настоящей работы являлось исследование возможности культивирования вируса в клеточном полислое («многослойный» метод), что в результате может существенно повысить эффективность технологии изготовления вакцины.

Материалы и методы

Вирусный материал. В работе использовали штамм «Владимир» вируса герпеса индеек (ВГИ) с инфекционной активностью 1,2х10^6 ФОЕ/см^3.

Культура клеток. Для культивирования вируса и определения его инфекционной активности использовали первично трипсинизированную культуру клеток КФ, которую получали из 11-дневных эмбрионов СПФ-кур (фирма «Hy-Vac», США). Трип-